

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

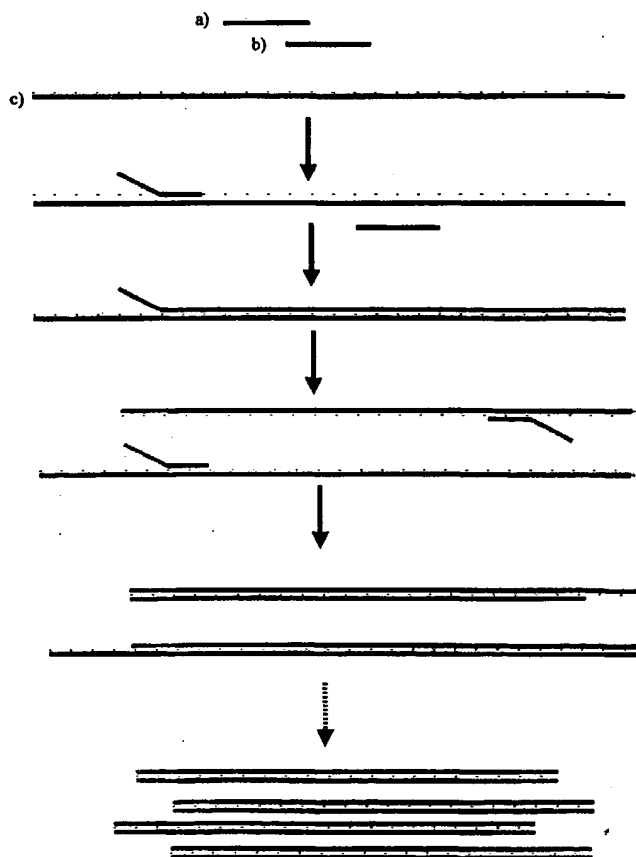
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/31186 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68 (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03901 [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).  
(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Oktober 2001 (10.10.2001) (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).  
(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
(30) Angaben zur Priorität: 100 50 942.8 10. Oktober 2000 (10.10.2000) DE  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN



(57) Abstract: A method for the detection of cytosine methylations in genomic DNA is disclosed, whereby genomic DNA samples are firstly reacted with a chemical reagent, whereupon 5-methylcytosine and cytosine react differently and thus display a different base pair relationship in the DNA duplex after said reaction. The pre-treated DNA is then amplified by means of a polymerase and at least one primer oligonucleotide and the amplified material once again reacted with a chemical reagent as above. The cytosine bases and/or guanine bases remaining in the amplified material after the renewed chemical treatment are detected in the final step.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA. Dazu wird zunächst genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen. Dann wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primeroligonukleotid amplifiziert und das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch wie oben umgesetzt. Die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen werden im letzten Schritt nachgewiesen.

WO 02/31186 A2



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

### Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur  
5 Detektion des Methylierungszustandes genomischer DNA Pro-  
ben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre  
in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebe-  
10 nen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in  
RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe  
der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschal-  
tet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Ge-  
ne in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist  
15 mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw.  
des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene  
Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzel-  
ner Gene oder des Genoms.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte  
Base in der DNA eukaryötischer Zellen. Sie spielt bei-  
spielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkripti-  
on, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese.  
Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil  
25 genetischer Information ist daher von erheblichem Inte-  
resse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht  
durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-  
Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist  
wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-  
30 Amplifikation die epigenetische Information, welche die  
5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten an-  
gewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-  
35 Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von  
Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer

Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov;17(3):275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2529-31, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioessays. 1994 Jun;16(6):431-6, 431; Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. Nu-

cleic Acids Res. 1994 Feb 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 95 45560.

10 Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie 15 Oligonukleotide bei vermindertem nichtspezifischem Hintergrundsignal entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. 20 Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben 25 vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das 35 Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation

des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor  
5 früher als größere.

MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S.  
10 (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ  
15 geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es  
20 zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass  
25 sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale  
30 DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den  
35 gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte

Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

5 Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

10 Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids  
15 Res. 1998 Nov 1;26(21):5009-10).

Es gibt demnach Verfahren, die es erlauben, Cytosin-Methylierung dadurch zu identifizieren, dass alle nicht methylierten Cytosine in eine bestimmte Base umgewandelt  
20 werden und lediglich die methylierten Cytosine nach der Amplifikation noch als Cytosin vorliegen. Damit ist es jedoch nicht ohne weiteres möglich, umgekehrt nach der Amplifikation alle noch vorhandenen Cytosinbasen ehemals methylierten Cytosinen zuzuordnen, da bei der Amplifikation  
25 im Gegenstrang immer noch Cytosin als Komplementäres zu dem nicht umgewandelten Guanin eingebaut wird. Dies stört jedoch, will man in einem einfachen Verfahren für Cytosin charakteristische Reaktionen ausnutzen, um methylierte Positionen zu bestimmen oder das Ausmaß der Methylierung in dem amplifizierten Abschnitt festzustellen.  
30 Dieses Problem soll in der vorliegenden Erfindung gelöst werden.

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das es erlaubt, in eine amplifizierte doppelsträngige DNA Markierungen einzubauen, die zur eindeutigen Iden-  
35



tifizierung von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben genutzt werden können. Diese Markierungen sollen die Verwendung einfacher etablierter molekularbiologischer Methoden zur Methylierungsanalyse erlauben.

5

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA gelöst, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

- 10 a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
- 15 b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens eines Primeroligonukleotids;
- c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
- 20 d) man weist die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nach.

- 25 Die Aufgabe wird ferner durch ein Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA gelöst, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

- a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
- 30 b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens eines Primeroligonukleotids;
- 35 c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und

Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;

d) man amplifiziert die chemisch behandelten Amplifikate aus Schritt c) erneut;

- 5 e) man weist die in dem Amplifikat verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nach. Diese erfindungsgemäße Verfahrenvariante umfasst zwei Amplifizierungsschritte.

10 Besonders bevorzugt ist bei den erfindungsgemäßen Verfahren dass die chemische Behandlung mit Natriumbisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit) erfolgt. Dabei ist es ferner besonders bevorzugt, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt.

15 Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist. Besonders bevorzugt ist dabei, dass das denaturierende Reagenz aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt ist:

20 Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF und/oder dass der Radikalfänger aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt ist:

30 Di-, Trihydroxybenzole, green tea extract, pine bark extract (Pycnogenol), Ginkgo Biloba extract (EGb 761), a flavonoid blend of several fruit and vegetable extracts (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-

butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, E, Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-  
132 Bisbetacarboxyethyl germanium sesquioxide, Superoxid  
5 dismutase (SOD), Superoxid katalase, Alpha-Naphthoflavone, Ginkgo biloba extract (EGb 761), Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionate und Cu(II)-Derivate, Mebendazole, CS (Chloroform soluble) alkaloidal extract, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-  
10 naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-  
15 Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-  
20 tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-  
25 1,2-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-  
35 5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-

- 5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-
- 5 5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-
- 10 hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-
- 15 4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthrachinon, 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-diol, 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-ol, 4-(3-Chlor-5,5,8,8-
- 20 tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat, 4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-
- 25 dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-benzoat, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
- 30 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-
- 35 tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-

naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.

Erfindungsgemäß ist auch bevorzugt, dass man Reagenzien, die für die chemische Behandlung der DNA eingesetzt wer-

den, vor der jeweils nachfolgenden Amplifikation ganz oder teilweise abtrennt. Bevorzugt ist auch, dass man die Probe nach der chemischen Behandlung vor der Amplifikation verdünnt. Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchführt und/oder dass man für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.

10 Ganz besonders bevorzugt ist aber auch ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei man vor den Amplifikationen eine Desulfonierung der DNA durchführt.

15 Bevorzugt ist auch, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Hybridisierungsreaktionen nachweist und/oder dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch spezifischen Einbau von nachweisbaren Markierungen an den Cytosin- und/oder Guaninbasen nachweist und/oder quantifiziert.

20 Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch ein Verfahren, wobei man in Schritt d) gemäß der ersten Verfahrensvariante oder Schritt e) gemäß der zweiten Verfahrensvariante für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:

30 a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer  
35 Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

(b) man verlängert das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

Bevorzugt ist dabei auch, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Sequenzierungsreaktionen nachweist.

Weiterhin ist bevorzugt, dass man in Schritt d) gemäß der ersten Verfahrenvariante oder Schritt e) gemäß der zweiten Verfahrensvariante für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:

(a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;

(b) man verlängert das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies

- und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;
- (c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer
- 5 Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-
- 10 Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.
- 15 Dabei ist weiterhin besonders bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA gemäß Schritt d) in der ersten Verfahrensvariante die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:
- 20 (a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die
- 25 hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- (b) man verlängert das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei mindestens
- 30 ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.
- 35 Bevorzugt ist auch ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte



und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht. Bevorzugt ist hierbei, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind oder dass die Markierungen Radionuklide sind oder dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Bevorzugt ist auch, dass bei einer der Amplifikationen einer der Primer an eine Festphase gebunden ist.

10

Insbeondere ist bevorzugt, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind. Bevorzugt ist auch, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist. Hierbei ist besonders bevorzugt, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

25

Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.

30

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Pa-

35

raffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.

5

Ein weitere Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Bevorzugt ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und optional Primern zur Herstellung der Amplifi-

35

kate, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1-28.

5 Beschrieben wird in der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung doppelsträngiger DNA aus einer genomischen DNA-Probe, die nach Durchführung des Verfahrens die Eigenschaft hat, dass CG Basenpaare nur noch an den Positionen vorliegen, an denen sich zuvor in der genomischen DNA Methylcytosinbasen befanden. Nachfolgend können  
10 jegliche Verfahren verwendet werden, die chemische, biologische oder physikalische Eigenschaften der CG Basenpaare ausnutzen, um die Positionen, an denen sich in der genomischen DNA-Probe Methylcytosinbasen befanden, kenntlich zu machen. Es werden dazu auch im folgenden viele  
15 bevorzugte Ausführungsvarianten aufgeführt, jedoch wird es unterstellt, dass der Fachmann von diesen abgeleitet oder alternativ weitere naheliegenden Möglichkeiten finden mag, CG Basenpaarungen nachzuweisen und für den hier vorgegebenen Zweck zu nutzen.

20 Die in dem Verfahren eingesetzte genomische DNA wird bevorzugt aus einer DNA-Probe erhalten, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe,  
25 beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.

Das Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in  
30 genomischer DNA wird durch folgende Schritte charakterisiert: Zuerst setzt man eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt  
35 wird. Anschließend wird im zweiten Schritt die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindes-

5 tens einem Primeroligonukleotid amplifiziert. Im dritten Schritt wird das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. Im letzten Schritt werden die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nachgewiesen.

10 In einer besonders bevorzugten Variante wird das Verfahren durch die folgenden Schritte charakterisiert: Das Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA wird durch folgende Schritte charakterisiert: Zuerst setzt man eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert  
15 bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. Anschließend wird im zweiten Schritt die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primeroligonukleotid amplifiziert. Im dritten Schritt wird das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. Im  
20 vierten Schritt werden die chemisch behandelten Amplifikate aus dem dritten Schritt erneut amplifiziert. Im letzten Schritt werden die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nachgewiesen.

30 Die chemische Behandlung erfolgt besonders bevorzugt mit einer Lösung eines Hydrogensulfits (= Disulfit, Bisulfit). Diese Behandlung führt unter geeigneten Bedingungen, wie dem Fachmann an sich bekannt, zu einer Addition  
35 des Hydrogensulfits an nicht methylierte Cytosinbasen. Auf diese Reaktion folgt eine praktisch quantitative Um-

wandlung der Aminofunktion des Cytosins in eine Ketofunktion, so dass ein sulfoniertes Uracil entsteht, welches durch alkalische Hydrolyse in Uracil überführt wird. Es erfolgt also auf diesem Wege eine selektive Umwandlung der nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil, während die 5-Methylcytosine unverändert bleiben. Diese Reaktion findet nur statt, wenn die DNA einzelsträngig vorliegt. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt daher die chemische Behandlung der DNA derart, dass diese in Agarose eingebettet vorliegt. Dadurch wird die Ausbildung von Duplexes verhindert.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird bei der chemischen Behandlung ein Lösungsmittel oder ein Reagenz zugesetzt, welches die DNA-Duplex denaturiert. Bei diesen Lösungsmitteln oder Reagenzien handelt es sich bevorzugt um Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykoldialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF.

Bevorzugt ist es zudem, einen Radikalfänger zuzusetzen, welcher den Abbau der DNA unter den Reaktionsbedingungen verhindert. Bei diesen Radikalfängern handelt es sich bevorzugt um Di-, Trihydroxybenzole, green tea extract, pine bark extract (Pycnogenol), Ginkgo Biloba extract (EGb 761), a flavonoid blend of several fruit and vegetable extracts (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C,

E, Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbetacarboxyethyl germanium sesquioxide, Superoxid dismutase (SOD), Superoxid katalase, Alpha-  
5 Naphthoflavone, Ginkgo biloba extract (EGb 761), Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionate und Cu(II)-Derivate, Mebendazole, CS (Chloroform soluble) alkaloidal extract, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-

butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-  
5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-  
5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-  
5 butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-  
tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-  
tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-  
hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-  
10 1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-  
hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-  
tetrahydro-1,4-anthrachinon, 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-  
4-hydroxyphenyl)-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-  
4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-  
15 tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthrachinon,  
5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-  
diol, 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-  
tetrahydronaphthalin-1-ol, 4-(3-Chlor-5,5,8,8-  
tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-  
20 yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-  
1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat,  
4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-  
benzoesäure, Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-  
dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, 4-(3-Hydroxy-  
25 5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-  
hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-  
hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-  
benzoat, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-  
1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure, 3-  
30 (3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-  
5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-  
tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion, 3-(3,5-Di-  
tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-  
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion,  
35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-  
dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-

hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,  
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-  
1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
5 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-  
naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-  
methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-  
4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-  
10 methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-  
methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-  
15 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-  
ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-  
hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
20 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-  
naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-  
hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-  
4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-  
(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-  
25 1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3-Brom-5-  
tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-  
hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
30 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-  
hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.

Bevorzugt ist zudem eine Variante des Verfahrens, in wel-  
35 cher die Reagenzien, die für die chemische Behandlung der  
DNA eingesetzt werden, vor der nachfolgenden Amplifikati-



on ganz oder teilweise abgetrennt werden. Dies kann beispielsweise durch Bindung der DNA an eine Festphase und Entfernen der Reagenzien durch Waschschrirte durchgeföhrt werden. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Probe nach der chemischen Behandlung jedoch lediglich verdünnt, so dass die Reagenzien in einer derart niedrigen Konzentration vorliegen, dass sie die unmittelbar nachfolgende Amplifikation nicht stören.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeföhrt. Besonders bevorzugt wird zudem eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet und die PCR für die Amplifikation eingesetzt, wie es dem Fachmann im Prinzip bekannt ist.

Bevorzugt ist es zudem, jeweils vor den Amplifikationen eine Desulfonierung der DNA durchzuföhren, da selbige aufgrund der chemischen Vorbehandlung noch über Sulfonsäuregruppen verfügen kann. Besonders bevorzugt erfolgt diese Desulfonierung in einem basischen Puffer, und idealerweise handelt es sich bei diesem basischen Puffer um den Puffer, der auch für die Amplifikationsreaktion eingesetzt wird.

Im folgenden werden nun mehrere, dem Fachmann überwiegend im Prinzip geläufige Verfahren beschrieben, wie die nach der Durchführung des Verfahrens verbleibenden Cytosin bzw. Guaninbasen, die nunmehr als Indikatoren für das Vorliegen von Cytosin-Methylierung in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe dienen, nachgewiesen werden können.

Besonders bevorzugt werden die verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen bzw. Cytosin-Guanin Basenpaare durch Hybridisierungsreaktionen nachgewiesen. Bevorzugt kann man diesen Nachweis derart ausföhren, dass die Amplifika-

tionsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert werden und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt: Im ersten Schritt wird die amplifizierte DNA an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer

5 Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind. Das Oligonukleotid oder die Oligonukleotide mit jeweils bekannter Sequenz von n Nukleotiden werden nun im nächsten Schritt mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins

10 in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe abhängt. So ist es beispielsweise möglich, dass nur dann eine Verlängerungsreaktion stattfindet, wenn an das 3'-Ende des Oligonukleotids auf der Template-DNA ein Guanin angrenzt, das den Einbau eines markierten Cytosins erlaubt. Die Anknüpfung des markierten Cytosins an das Oligonukleotid dient dann letztendlich als Nachweisreaktion für das Vorliegen eines methylierten Cytosins in der ursprünglichen genomischen Probe.

15

20

25 Weiterhin ist es möglich, dass die nach der zweiten chemischen Behandlung (und optionalen zweiten Amplifikation) verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Sequenzierungsreaktionen nachgewiesen werden. Dem Fachmann sind vor allem die Sequenzierung nach Sanger und die Sequenzierung nach Maxam-Gilbert geläufig. Vor allem letztere

30 bietet sich hier an, da in der Duplex nur noch dort CG Basenpaare vorliegen, wo sich zuvor ein Methylcytosin in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe befand. Es ist also möglich, durch die C und/oder die G spezifischen

35 Spaltungsreaktionen Fragmente zu erzeugen, deren Grösse unmittelbar von dem Methylierungszustand der Probe anhängt.

gen. Diese Fragmente können dann beispielsweise auf Sequenziergelen oder durch Kapillarelektrophorese hinsichtlich ihrer Grösse bestimmt werden. Gegenüber einer nur einfachen Bisulfitbehandlung, wie sie im Stand der Technik beschrieben wird, spielt das hier beschriebene Verfahren in dieser Variante auch den besonderen Vorteil aus, dass die Spaltung des jeweiligen Gegenstranges nicht erfolgen kann, da dieser entweder kein C oder kein G enthalten kann. Dadurch ist die Zahl der entstehenden Fragmente deutlich reduziert und auch, falls mehrere Amplifikate gleichzeitig untersucht werden, eine viel übersichtlichere Auswertung möglich.

Bevorzugt ist zudem eine Variante des Verfahrens, in der für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert werden und anschliessend die folgenden Teilschritte ausgeführt werden: Im ersten Schritt hybridisiert man einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Grösse eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist. Im zweiten Schritt wird das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oli-

gonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt. Beispielsweise ist es möglich, dass eine Verlängerung des 3'-Endes nur dann erfolgt, wenn in der chemisch vorbehandelten DNA ein Thymin anstelle eines Cytosins vorliegt, da beispielsweise in dem verwendeten Nukleotidmix Guanin nur als Terminator vorhanden ist und damit die Verlängerung, falls ein Cytosin vorliegt, unterbrochen wird. Ein Cytosin wiederum ist nach der chemischen Behandlung nur dann zugegen, wenn an der betreffenden Position in der ursprünglichen DNA-Probe ein 5-Methylcytosin vorlag.

Im letzten Schritt inkubiert man die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.

Bevorzugt ist zudem ein Verfahren, wobei für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert werden und anschliessend die folgenden Teilschritte ausgeführt werden: Im ersten Schritt hybridisiert man die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind. Im zweiten Schritt

wird das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein

5 Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt. So kann beispielsweise eine Verlängerung nur dann stattfinden, wenn die genomische DNA an der Position, an die das oben genannte

10 Oligonukleotid mit seinem 3'-Ende bindet, ursprünglich unmethyliert vorlag, weil sonst nach der chemischen Vorbehandlung an dieser Position ein Cytosin verbleibt, welches nach der Bindung des Oligonukleotids einen Mismatch am 3'-Ende verursacht welche die Verlängerung unterbin-

15 det. Liegt keine Methylierung vor, so kann der Primer dagegen ohne Mismatch mit dem 3'-Ende an die Template-DNA binden.

Die Analyse der entstandenen DNA-Oligomere, die zum Nachweis der Cytosin-Methylierung dienen, kann beispielsweise über Fluoreszenzmarkierungen erfolgen, welche über markierte Nucleotide in die DNA eingebaut werden.

20

Dem Fachmann ist zudem geläufig, dass man die meisten der beschriebenen Nachweisreaktionen auch derart ausführen kann, dass beteiligte Oligonukleotide an eine Festphase gebunden sind.

25

So ist es beispielsweise besonders bevorzugt möglich, die PCR nach der zweiten chemischen Behandlung derart auszuführen, dass radioaktiv oder fluoreszent markierte C und/oder G Nukleotide eingebaut werden und zudem einer der PCR-Primer an eine Festphase gebunden ist. Nach der Entfernung aller nicht an die Festphase gebundenen Edukte und Produkte verbleibt ein an die Festphase gebundenes

30

35 PCR-Produkt, in welchem die Anzahl der eingebauten Mar-

kierungen proportional ist zur Anzahl der der nach der zweiten chemischen Behandlung verbliebenen Guanin- und/oder Cytosinbasen und damit unmittelbar von der Anzahl der Cytosin-Methylierungen in der genomischen Probe abhängt. Damit ist eine direkte Quantifizierung der methylierten Cytosine in diesem PCR-Produkt möglich.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind.

Besonders bevorzugt sind diese Markierungen Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden, oder Kombinationen davon.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen und sind somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert. In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachgewiesen. Bevorzugt werden diese Fragmente der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt. In einer wiederum besonders bevorzugten Ausführung des Verfahrens weisen die erzeugten Fragmente zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.

Besonders bevorzugt werden die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Mas-

senspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem die Verwendung des beschriebenen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-  
10 Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

25 Weiterhin besonders bevorzugt ist die Verwendung des Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und/oder Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens.  
35

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne diese einzuschränken.

Beispiel 1:

- 5 Veränderung einer genomischen Sequenz durch zweifache Behandlung mit Bisulfit

Als Beispiel zur Erläuterung des Verfahrens soll hier die folgende doppelsträngige DNA-Sequenz dienen, die ein potentiell methyliertes CG Dinukleotid enthält:

A 3'-TGATCTAGCATGACTAC-5'

B 5'-ACTAGATCGTACTGATG-3'

- 15 Die doppelsträngige Sequenz kann verwendet werden, um nachteilige Ereignisse einer bestimmten Kategorie für Patienten oder Individuen zu untersuchen. Man setzt eine genomische, unbekannt methylierte DNA-Probe (20 ng), die mit einem Restriktionsenzym, hier MssI, verdaut wurde,
- 20 ein. Die verdaute DNA wird mit Hydrogensulfit (Bisulfit, Disulfit) und einem Radikalfänger bei erhöhter Temperatur chemisch umgewandelt. Ein Reagenz oder Lösungsmittel, welches die Denaturierung unterstützt, wird zugesetzt. Die DNA wird zuerst thermisch denaturiert und anschließend mit Bisulfit, dem Radikalfänger und dem denaturierenden Reagenz versetzt und längere Zeit bei erhöhter Temperatur inkubiert. Die Bisulfitreaktion führt zur Umwandlung aller nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil.
- 25 Zur Reinigung der Bisulfit behandelten DNA wird diese auf eine Reversed Phase C18 Festphase gebunden und durch Waschen mit einer geeigneten Pufferlösung von Chemikalien befreit. Anschließend wird die DNA mit einem polaren Lösungsmittel wie z. B. Acetonitril oder Wasser eluiert und auf ein kleineres Volumen konzentriert. Die alkalische
- 30 Hydrolyse der mit Bisulfit behandelten Fragmente erfolgt unmittelbar vor der spezifischen Amplifikation unter ba-
- 35



sischen Bedingungen. Danach wird die Probe unter Verwendung von je 25 pmol an spezifischen Primeroligonukleotiden (enthalten keine CG Dinukleotide) vervielfältigt. Nach der ersten Behandlung mit einer Lösung eines Hydrogensulfits, wobei eine Umwandlung der nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil erfolgt, und nachfolgender PCR, die die nach der chemischen Behandlung mit Hydrogensulfit nicht mehr komplementären Stränge amplifiziert und zugleich Uracil im wesentlichen durch Thymin ersetzt, ergeben sich die folgenden doppelsträngigen DNA-Sequenzen:

A) für den Fall, dass CG (+) methyliert vorlag:

aus dem unteren Strang B:

15 C (+) 3'-TAATCTAGCATAACTAC-5'  
B' (+) 5'-ATTAGATCGTATTGATG-3' Sequenz L(up)

aus dem oberen Strang A:

20 A' (+) 3'-TGATTTAGCATGATTAT-5'  
D (+) 5'-ACTAAATCGTACTAATA-3' Sequenz U(up)

B) für den Fall, dass CG (-) unmethyliert vorlag:

25 aus dem unteren Strang B:

C (-) 3'-TAATCTAACATAACTAC-5'  
B' (-) 5'-ATTAGATTGTATTGATG-3' Sequenz L(down)

aus dem oberen Strang A:

30 A' (-) 3'-TGATTTAGTATGATTAT-5'  
D (-) 5'-ACTAAATCATACTAATA-3' Sequenz U(down)

Die zweite Behandlung Hydrogensulfit wird analog der ersten durchgeführt. Die Amplifikate werden zuerst thermisch denaturiert und dabei durch Zugabe eines Reagenzes oder Lösungsmittels unterstützt, dann chemisch umgesetzt und

anschließend amplifiziert, wobei die alkalische Hydrolyse wiederum kurz vor der Amplifikation durchgeführt wird.

Die zweite spezifische Amplifikation kann mit einem Teil der Bisulfit behandelten Probe durchgeführt werden. Die

5 Reaktionslösung kann so lange verdünnt werden, dass die in der Hydrogensulfitreaktion benötigten Chemikalien die PCR nicht mehr stören. Andererseits kann die Probe wieder mittels einer Reversed Phase C18 Festphase gereinigt werden. Die doppelt hydrogensulfitbehandelte DNA wird unter  
10 Verwendung von je 25 pmol an spezifischen Primeroligonukleotiden (enthalten keine CG Dinukleotide) vervielfältigt. Dabei müssen die Sequenzen der Primeroligonukleotide der ersten und zweiten Amplifikation nicht übereinstimmen.

15

Nach der zweiten Behandlung mit einer Lösung eines Hydrogensulfits, wobei wiederum eine Umwandlung der nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil erfolgt, und nachfolgender PCR, die die nach der chemischen Behandlung mit  
20 Hydrogensulfit nicht mehr komplementären Stränge amplifiziert und zugleich Uracil im wesentlichen durch Thymin ersetzt, ergeben sich nunmehr die folgenden doppelsträngigen DNA-Sequenzen:

25 A) für den Fall, dass CG (+) methyliert vorlag:

aus dem unteren Strang B' und C:

30 E (+) 3'-TAATCTAACATAACTAC-5' Sequenz LL(up)  
B'' (+) 5'-ATTAGATTGTATTGATG-3'

C' (+) 3'-TAATTTAGTATAATTAT-5'  
F (+) 5'-ATTAAATCATATTAATA-3' Sequenz LU(up)

35 aus dem oberen Strang D und A':

G (+) 3'-TAATTTAACATAATTAT-5'  
 D' (+) 5'-ATTAAATTGTATTAATA-3' Sequenz UL(up)

H (+) 3'-TGATTTAGTATGATTAT-5'  
 5 A'' (+) 5'-ACTAAATCATACTAATA-3' Sequenz UU(up)

B) für den Fall, dass CG (-) unmethyliert vorlag:

10 aus dem unteren Strang C und B':

E (-) 3'-TAATCTAACATAACTAC-5'  
 B'' (-) 5'-ATTAGATTGTATTGATG-3' Sequenz LL(down)

15 C' (-) 3'-TAATTTAATATAATTAT-5'  
 F (-) 5'-ATTAAATTATATTAATA-3' Sequenz LU(down)

aus dem oberen Strang D und A':

G (-) 3'-TAATTTAATATAATTAT-5'  
 20 D' (-) 5'-ATTAAATTATATTAATA-3' Sequenz UL(down)

H (-) 3'-TGATTTAGTATGATTAT-5'  
 A'' (-) 5'-ACTAAATCATACTAATA-3' Sequenz UU(down)

25 Die Sequenzen UU sind unabhängig vom Methylierungsstatus  
 der Probe identisch; das gleiche gilt für die Sequenzen  
 LL. Somit sind beide Sequenzen für die Bestimmung des Me-  
 thylierungsstatus nicht verwendbar. LU und UL jedoch un-  
 terscheiden sich an den ehemaligen CG Positionen in Ab-  
 30 hängigkeit vom Methylierungsstatus der DNA-Probe (in den  
 Sequenzen hervorgehoben). Bemerkenswert und der eigent-  
 lich Vorteil der Methode ist insbesondere, dass in den  
 jeweiligen Strängen Cytosin bzw. Guanin nur dann auftau-  
 chen, wenn zuvor eine Methylierung vorlag. Damit liegt  
 35 praktisch eine Übersetzung der Methylcytosinbasen in der  
 genomischen Probe in eine auch für den Doppelstrang cha-

5        charakteristische Base vor, während bei der einfachen Bisulfit-  
Behandlung die Base jeweils nur in einem der beiden  
Stränge für Methylcytosin charakteristisch ist. Dies er-  
laubt nun die Anwendung praktisch aller, dem Fachmann be-  
10        kannten Methoden zur Sequenzierung (wie zum Beispiel Se-  
quenzierung nach Maxam-Gilbert) oder zur Genotypisierung,  
ohne dass auf den Gegenstrang Rücksicht genommen werden  
muss. Wird beispielsweise eine sequenzspezifische Spal-  
10        tung der nach der zweiten Bisulfit-Behandlung amplifi-  
zierten DNA an Cytosinbasen durchgeführt, so erfolgt nur  
eine Spaltung des einen Stranges, der andere bleibt un-  
verändert.

15        Beispiel 2: Veränderung einer genomischen Sequenz durch zwei-  
fache Behandlung mit Bisulfit

Als Beispiel wurde das Gen HSMDR1 des humanen Genoms gewählt.  
Im Experiment wurden nach einer ersten Bisulfitbehandlung DNA-  
Fragmente der Länge 2010 bp dieses Gens erzeugt und gleichzei-  
20        tig gc-reiche Domänen am 5'- und 3'-Ende generiert. Da diese  
„künstlichen“ Enden am 5'-und 3'-Ende der PCR-Produkte nach  
der ersten Bisulfitbehandlung erzeugt wurden, unterliegen sie  
in der zweiten Bisulfitbehandlung einer einfachen Umwandlung.  
Dies führt zu einer höheren Spezifität dieser Domänen, da sie  
25        (im Gegensatz zur übrigen Sequenz) noch C's und G's enthalten.  
Damit eignen sie sich besonders für das Design von Primern für  
eine Amplifikation nach der zweiten Bisulfitbehandlung. Die  
Amplifikation eines kurzen Stückes der Ziel-DNA erfolgt mit  
Primern die ausschließlich aus A's und T's bestehen. Die Se-  
30        quenzen der genomischen, einfach bisulfitbehandelten und dop-  
pelt bisulfitbehandelten DNA sind am Ende dargestellt.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1:

Schema zur Herstellung von PCR-Produkt mit gc-Domäne aus einfach bisulfitbehandelter DNA:

a) 5'gtgatcccgggcgagctccctTAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTG;

b) 3'gcttgggctgcaggtcgaccTTTAAACCTTCTATCTCATCAAC;

5 c) bisulfitbehandelte DNA, Einzelstrang

Figur 2:

Genomische Sequenz der Umgebung des HSMDR1-Gens: LOCUS  
HSMDR1A2932 bp DNA humanes MDR1 (multidrug resistance)  
10 Gen für das P-Glycoprotein

Figur 3:

Sequenz des oberen Strangs nach der ersten Bisulfitbehandlung  
für den Fall vollständiger Aufmethylierung der CG's (PCR-  
15 Produkt mit Primer 1 und 2)

Figur 4:

Sequenzen des unteren Strangs nach der zweiten Bisulfitbehandlung  
für den Fall vollständiger Aufmethylierung aller CG's

20 a) PCR-Produkt mit Primer 3 und 4 (154 bp)

b) PCR-Produkt mit Primer 5 und 6 (2010 bp)

Vorgehen:

25 a) Restriktion von humaner DNA unbekannten Methylierungsstatus  
mit Mss1

b) Bisulfitbehandlung mit der Agarosemethode

c) Bisulfit-spezifische PCR zur Herstellung von MDR1-Fragmenten einer Länge 1936bp. Dabei werden gleichzeitig mittels Domäne-Primern „künstliche“ gc-reiche Enden an die PCR-Produkte generiert

5

d) Zweite Bisulfitbehandlung ohne Agarose mit anschließender ZipTip-Aufreinigung

10 e) Amplifikation der doppelt bisulfitbehandelten DNA mittels Primern für die gc-Domäne

Verwendete Primer:

*Bisulfit Primer, Produktgröße: 2010 bp*

1 MDR1-B-U-gc     *gtgatcccgaggcgagctcccTAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTG*  
 2 MDR1-B-L-gc     *gcttgggctgcaggtcgacCTTTAACCTTCTATCTCATCAAC*  
                          <--gc-domäne-----><-genspezifische Sequenz-->

15

*Primer für doppelt bisulfitierte DNA ohne gc-Domäne, Produktgröße: 154 bp*

3 MDR1-2B-U3     *ttttttttttattttttttattat*  
 4 MDR1-2B-L3     *attttttttttattattttttaat*

20

*Primer für doppelt bisulfitierte DNA mit gc-Domäne, Produktgröße: 2010 bp*

5 MDR1-2B-L-gc     *GTTTGGGTTGTAGGTTGAT*  
 6 MDR1-2B-U-gc     *ataatcccaaactccc*

Versuchsbedingungen:

25 Die Restriktion von humaner genomische DNA (Fa. Promega) erfolgte mit Mss1 (Fa. Fermentas) nach Herstellerangaben.

Die erste Bisulfitbehandlung der verdauten DNA erfolgte mit der Agarosemethode, wie sie im Stand der Technik beschrieben ist.

5

Die Amplifikation von DNA erfolgte unter folgenden PCR-Bedingungen (FA. Qiagen):

- 1 µl DNA (10 ng bisulfitbehandelte DNA)
- 10 •0.2 µl Taq (1 Unit)
- 0,2 µl dNTP (25 mM each) 0,25 mM final
- 1 µl Primer1 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl final
- 1 µl Primer2 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl final
- 2,5 µl 10fach PCR-Puffer
- 15 •19,1 H<sub>2</sub>O (molecular grade)

Folgende Cyclor-Programme wurden verwendet:

- 20 •PCR mit Domäneprimern (Primer1 und 2) nach erster Bisulfitbehandlung:  
95°C/20:00; 95°C/1:00; 56 °C/0:45; 72°C/2:00; cycles:40; 72°C/10:00; 4°C/end
- PCR nach zweiter Bisulfitbehandlung(Primer 3 und 4):  
25 95°C/20:00; 95°C/1:00; 40 °C/0:45; 72°C/1:00; cycles:40; 72°C/10:00; 4°C/end
- PCR nach zweiter Bisulfitbehandlung(Primer 5 und 5):  
95°C/20:00; 95°C/1:00; 56 °C/0:45; 72°C/2:00; cycles:40; 72°C/10:00; 4°C/end

30

Die zweite Bisulfitbehandlung des hergestellten PCR-Productes erfolgte ohne Agarose in Lösung . Zur Entfernung der Salze und Chemikalien wurde die doppelt bisulfitierte DNA mit Hilfe der

ZipTip®-Methode (FA: Millipore) aufgereinigt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- neue Spitze 3x mit 10 µl 2M TEAA Puffer gespült
- 5   •35 µl PCR-Produkt aufgezogen
- 1x Spülen mit 10 µl 2M TEAA
- 3x Spülen mit 10 µl 0.1M TEAA
- 3x Spülen mit 10 µl Wasser (bidest.)
- Eluieren des Produktes mit 100 µl MeCN (10x10 µl frisches
- 10    MeCN aufgezogen und in ein Tube eluiert
- 100 µl Eluat wurden unter Vacuum eingetrocknet, in 30 µl Wasser (bidest) resuspendiert und sofort in die PCR eingesetzt



## Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in  
5 genomischer DNA, dadurch gekennzeichnet, dass man die  
folgenden Verfahrensschritte ausführt:
  - a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Rea-  
genz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert  
bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Ba-  
10 senpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umge-  
wandelt wird;
  - b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Ver-  
wendung einer Polymerase und mindestens eines Prime-  
roligonukleotids;
  - 15 c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz  
chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt  
und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaa-  
rungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt  
wird;
  - 20 d) man weist die in dem Amplifikat nach der erneuten  
chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen  
und/oder Guaninbasen nach.
2. Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in  
25 genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-  
net, dass man die folgenden Verfahrensschritte aus-  
führt:
  - a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Rea-  
genz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert  
30 bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Ba-  
senpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umge-  
wandelt wird;
  - b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Ver-  
wendung einer Polymerase und mindestens eines Prime-  
35 roligonukleotids;
  - c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz

chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;

5 d) man amplifiziert die chemisch behandelten Amplifikate aus Schritt c) erneut;

e) man weist die in dem Amplifikat verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nach.

10 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung mit Natriumbisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit) erfolgt.

15 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt.

20 5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.

25 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das denaturierende Reagenz aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt ist:  
Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF.

30 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Radikalfänger aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt ist:

Di-, Trihydroxybenzole, green tea extract, pine bark  
extract (Pycnogenol), Ginkgo Biloba extract (EGb  
761), a flavonoid blend of several fruit and vege-  
table extracts (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp),  
5 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordi-  
hydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-  
tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,6-Di-tert-  
butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-  
di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-  
10 Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, E, Q, Hydrochinon,  
Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Cur-  
cumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbe-  
tacarboxyethyl germanium sesquioxide, Superoxid dis-  
mutase (SOD), Superoxid katalase, Alpha-  
15 Naphthoflavone, Ginkgo biloba extract (EGb 761),  
Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionate und Cu(II)-  
Derivate, Mebendazole, CS (Chloroform soluble) alka-  
loidal extract, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-  
hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-  
20 Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-  
naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
1,2-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-  
hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-  
tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-  
25 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
3-methoxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-  
hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-  
Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon, 4-  
(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-  
30 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-  
anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-  
anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-  
35 anthrachinon, 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-  
hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-

tetrahydro-1,2-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthrachinon, 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-diol, 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-ol, 4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat, 4-(3-

Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-  
benzoesäure, Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-  
dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, 4-(3-Hydroxy-  
5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-  
5 hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-  
hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-  
benzoat, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-  
1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure,  
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-  
10 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclo-  
penta[b]naphthalin-1,2-dion, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-  
oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-  
5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion, 2-(3,5-  
Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-  
15 dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-  
hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-  
20 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-  
naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-  
25 tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-  
1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxy-  
phenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-  
(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-  
dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-  
30 hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphth-  
ochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-  
ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
35 3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-  
tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-

- naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-  
naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-  
2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-  
butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-  
naphthochinon, 2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxy-  
phenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-  
(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-  
dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-  
hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphth-  
ochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-  
hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.
8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass man Reagenzien, die für  
die chemische Behandlung der DNA eingesetzt werden,  
vor der jeweils nachfolgenden Amplifikation ganz oder  
teilweise abtrennt.
9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass man die Probe nach der  
chemischen Behandlung vor der Amplifikation verdünnt.
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikation  
von mehreren DNA-Abschnitten gleichzeitig in einem  
Reaktionsgefäß durchführt.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass man für die Amplifikati-  
on eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.
12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass man vor den Amplifikati-

onen in den Ansprüchen 1 oder 2 eine Desulfonierung der DNA durchführt.

- 5 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Hybridisierungsreaktionen nachweist.
- 10 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch spezifischen Einbau von nachweisbaren Markierungen an den Cytosin- und/oder Guaninbasen nachweist und/oder quantifiziert.
- 15 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man in Schritt d) gemäß Anspruch 1 oder Schritt e) gemäß Anspruch 2 für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an
- 20 einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:
- 25 a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- 30 (b) man verlängert das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Sequenzierungsreaktionen nachweist.

5

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man in Schritt d) gemäß Anspruch 1 oder Schritt e) gemäß Anspruch 2 für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:

10

(a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;

15

20

25

(b) man verlängert das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;

30

35

(c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart



einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA gemäß Schritt d) in Anspruch 1 die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:

(a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

(b) man verlängert das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

19. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte

und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht.

- 5      20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 10      21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
- 15      22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 20      23. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei einer der Amplifikationen einer der Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 25      24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 30      25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist.
- 35      26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch

Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.

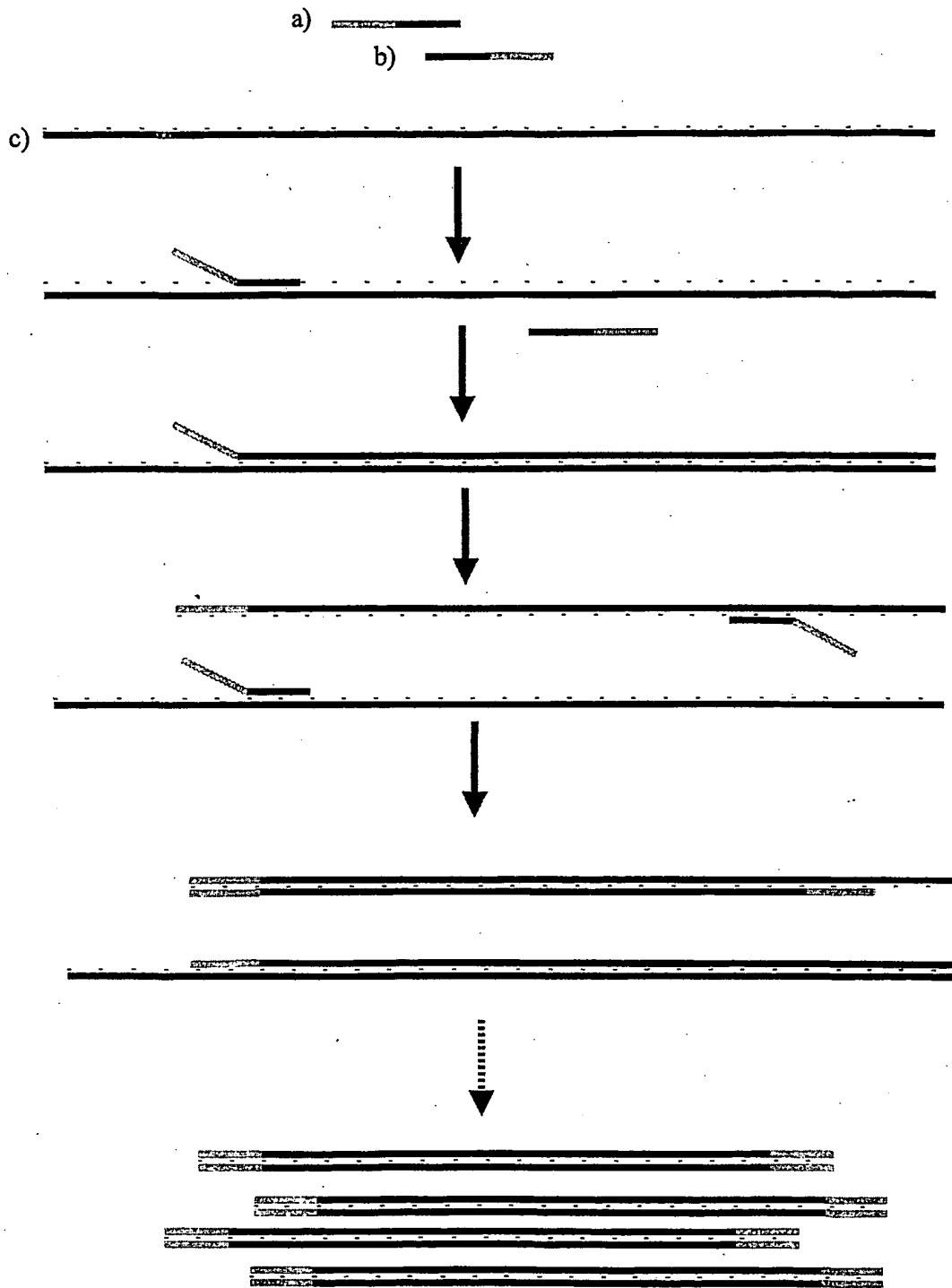
- 5 27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
- 10 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.
- 15 29. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.
- 20 30. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens
- 30 einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kar-
- 35

5       diovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung;  
Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastroin-  
testinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder  
Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung,  
10       Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehl-  
funktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als  
Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,  
Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des  
Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabo-  
10       lische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopf-  
schmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

31. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche  
1 bis 29 zur Unterscheidung von Zelltypen oder Gewe-  
15       ben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

32. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Rea-  
genz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln,  
sowie Radikalfängern und optional Primern zur Her-  
20       stellung der Amplifikate, sowie optional einer Anlei-  
tung zur Durchführung eines Assays nach einem der An-  
sprüche 1-29.

**Fig. 1**



**Fig. 2**

1 gccagaacaaaatatcaagataaggaaaattttagtcaagaatagaaaaaattat  
61 ggctttgaagtatgagttatttaaagaaagtggaaacatcctcagactatgcagtaaaaa  
121 acaagtgattttcttcttaacttatgcaataaactgataggtaatatgtgaaagtc  
181 atagaatgtagactagaggatacaacaacctatttctctatgttcataagaagtaaga  
241 aaagctctgatgtgagttagcattgctttacaattttgaattgtgcagattgcacgtact  
301 tttcctcagttgaagtaaatagtggacaggaaaaatattaaatgttggcagtaaataat  
361 ggaaggaaattacaactaatgtaatatgctaaacatgctatgtttattttactaatttg  
421 aattaaaatgtaagaatttaaatagccttgaaaaacacgggcattgatctgacgtctga  
481 agttttaaaatattacacacttgaaatagcatttgaccttgaaatacctgtctctata  
541 tattttttaaaacttcttttcttccatttatcatcaaataaaggatgaacaga  
601 tgtaactcagaaactgtcaagcatgctgaagaaagaccactgcagaaaaatttctcctag  
661 cttttcaaagggtgttaggaagcagaaaggatgacagaattggagaggtcggagttttt  
721 gtattaactgtattaaatgcgaatcccgagaaaaatttccctaactacgtcctgtagtta  
781 tatggatatgaagacttatgtgaacttgaaagacgtgtctacataagttgaaatgtccc  
841 caatgattcagctgatgcgctttctacttgcccttctagagaggtgcaacggaagc  
901 cagaacattcctcctggaaattcaacctgtttcgagtttctcgaggaatcagcattcag  
961 tcaatccgggcccgggagcagtcctgtgttgaggctgattggctgggcaggaacagcgc  
1021 cggggcggtgggctgagcacagccgcttcgctctcttggcacaggaagcctgagctcatt  
1081 cgagtagcggctcttccaagctcaaagaagcagaggccgctgttcgtttcctttaggtct  
1141 ttccactaaagtcggagtatcttcttcaaaatttcacgtcttggtggccgttccaagga  
1201 gcgcgaggtaggggacgcaaagctgggagctactatgggacagttccaagtgtcaggc  
1261 tttcagatttctgaacttggtcttcacgggagaagggtctttagggcggtgtagtgt  
1321 gaagtctctggcaagtccatggggaccaagtggggttagatctagactcaggagctcct  
1381 ggagcagcgcccaaaccgtagtggaactggaccatgttgcgggagcgcgacagcccg  
1441 gcggtgcggggacctgctctgagcccgggcggtgggtgggaggaagcatcgtccgc  
1501 ggcgactggaaccgggaggggagaatcgactggcgggggcaaagtccagaacgcgctgc  
1561 cagaccccaactctgccttcgtggagatgtggagaccccgcgacaggaaagcccctg  
1621 cagtgcccatcgcgccagagcagctggggcatcaacggcgggcgctccctctactgct  
1681 ctctggcttcgacgggggactagaggttagtctcacctccagcgcgctgaggctcatgc  
1741 atttgctaatagactgcggtttcttccaggtcgggatggatctgaaggggaccgcaa  
1801 tggaggagcaaagaagaagaactttttaactgaacaataaaaggtaactagcttggtt  
1861 catttcatagtttacatagttgcgagatttgagtaattatttctagcctccagctctg  
1921 aaataaatgacatgttggtgttttaattattttaagaaacgcaagctagccttggaa  
1981 tcaatatccctgcttagagcagaagttgttggtgagtgaggacagcatatgcatttt

Fortsetzung Fig. 2

2041 ccctgtctttttgttctttctttaatgatacataatattttacatatttatgaaatgg  
2101 ggtacatggaagcgtttttacatgcccgaatgtgtaatgatcaagtcgggtatttga  
2161 aggatacatcaccttaggtatatttcatttctatgtgttgataacattttaagtcttcta  
2221 gctactttgaaatatacaatatattgctaactgtagtcaccctcgtctgctatcgaacat  
2281 tggaacttatttgcctatccaaccgttcttagtcattcaccaaccttttcatttcac  
2341 ctttttacccttccggcctcttcccttagtcttggtgctccttttctcagctttct  
2401 gccccagacaggcggtatgctcatatgtgttctgtcttatgaacttctgctttcaagt  
2461 gtgttggtcgccacacgtgagccatattgctgtggtgatctgctgtggtccaggctc  
2521 ttgcttccggtaaatggctatgtaaacatcggtttgtggcctggctgatgagacagaag  
2581 gtcaaaagtacatttaggttgtaactggcaataaatatctgtatataatattgtaatg  
2641 taatcatatagggaaaataattatttaaagtaaatttgatcatggtgctctgcctttat  
2701 agaataatttaaaacttcactaaatagattcattgttagtagtaaattgtaaàatagacta  
2761 gtaagtttaataatattagaaactgtaatgtaaattataagataaattagctaaacacat  
2821 taatattataagaaaccaagcttttcagtgaagagaaaaatacaaatgtggaaatcaa  
2881 atacatttttaaaaataatgtaagttgaattagaatttcaatatgaatt

**Fig.3**

**5'gtgatccccgggcgagctcccTAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGtagaaaaattttttagtttttaaagggtgtt  
aggaagtagaaaagggtgatatagaattggagaggtCGgagttttgtattaattgtattaaatgCGaatttCGagaaaaattttttaattaC  
GttttgtagtatatggatatgaagattatgtgaattttgaagaCGtgtttatataagttgaatgttttaatgatttagttgatgCGCGttt  
tttatttgttttttagagagggtgtaaCGGaagttagaatatttttttgaaattaatgtttCGtagttttCGaggaattagtatttagtta  
attCGggtCGggagtagttatttgggtgaggttgattggttgggttaggaatagCGtCGgggCGtggttgtagtatagtCGtttCGtttt  
ttttgtataggaagtttgagtttattCGagtagCGgtttttaagtttaagaagtagaggtCGttgttCGtttttttaggttttttattaaag  
tCGgagtattttttaaaattttaCGtttgggtgttCGtttaaggagCGCGaggtgaggggtCGtaaagttgggagttattatgggata  
gttttaagtgttaggttttagattttgaatttggttttaCGggagaaggggttttgaggCGtgatagtgtgaagtttttggaagtttat  
ggggattaagtggggttagatttagatttaggagttttggagtagCGttaaatCGtagtggtattggattatgtgttCGgagCGCGtat  
agttCGCGCGgtgCGgggatttgtttttgagttCGCGggCGgtgggtgggaggaagtatCGttCGCGgCGattggaatCGggag  
ggagaatCGtattggCGgCGggttaaagtttagaaCGCGttgttagattttaattttgttttCGtgagatgttgagatttCGCGtatag  
gaaagttttgtagtgtttatCGCGgttagagtagttggggatttaaCGgCGggCGtttttttatgttttttggtttCGaCGggggatta  
gaggttagttttatttttagCGCGtttaggtttatgtatttggttaattgagttgCGgttttttttaggtCGggatggatttgaaggggatCG  
taatggaggagtaaagaagaagaattttttaattgaataataaaaggtaattagtttgtttatttttatagtttatatagttgCGagatttga  
gtaatttatttttagtttttagttttgaaataaatgatattgttgttttaattatttttaagaaaCGtaagttagttttggaattaatattttgttt  
agagtagaagttgttgggtgagtgaggtatagtatatgtattttttgttttttttttttaattgatataataatttatatttatgaaat  
ggggtatatggaagCGtttttatatgttCGGaattgttaattgattaagttCGggtatttgaaggatatatttttaggtatttttattttatg  
tgttgataatattttaagtttttagtttttgaaatatataattgttaattgtagtttttCGttgtttatCGaatattggaatttatttgtttt  
atttaaatCGtttttagttatttataattttttttttttttttttttCGgttttttttttagttttggtgtgttttttttagttttttgttttaga  
taggCGgatgtttatatgtgtttttgtttatgaattttgtttttaagtgggtgttggCGtttataCGtgagttatatgttgttgggtgatttgtttg  
tggttaggtttttgtttCGgtaaatggttatgtaaataatCGCGtttgtgtttg**GTTGATGAGATAGAAGGTTAAAGgtc**  
**gacctgcagcccaagc****



**b) gtttgggttgtaggttgat**tttttaattttttattttattataaattataaatgtgatatttatataattatttattgaaaaataaaaattta  
aattataaaaaataattattaataatatataatttatgtataaatgattaatattttttaaaaaataaaaattttataaaaaataaaaatatataaa  
atatttgtttattttaaaaaataaaaaaattaaaaaaaatatataaaattaaaaaaaataaattgaaaaaaataaaaaataaaaataaa  
aaaaaattaataaataaataaaaaatgattaaataaaaaataaataaattttaatatgtgataataaatgaaaataattataaataatatatt  
atatattttaaaaaataaaaaaattaaaaatatattaatatataaaaaataaaatatatttaaaataatatatttttaaatatttgaattaat  
tatttatattttgaaatatataaaaaatgtttttatatattttttataaatatataaaatattatatattttaaaaaaaaataaaaaaa  
ataaaaaaaatatatatattatttttttaattataaattttttattttaaaaaataaataattaattttaaaaaattaattatgttttttaaaaaa  
attaaaaataataatatatttttttttaaaattaaaaattaaaaataaatttttaaaattttgtaattataaaattataaaaaataaaataa  
attaattattttttatttttaattttaaaaaaatt  
attaattaaatatataaattttaaatgtgttaaaaaataaaattaatttttaattttttgttgaaattaaaaaataataaaaaaaatgtttgttg  
ttaatattttaattatttttaattgtgataaatattataaaaaatttttttatatgtgaaattttaatatttttatgaaaataaaattaaaaattta  
aatgtgttttaaaattttttgttgtaaatatgatt  
taaaattttgtattgtgtgaattatattgtttttgaataataaatttaatatattatgatttaaatgttattttaaaaaattttaaaatttaattta  
attttatttaattttttataaattttttaaaaaatttttatattattatgttttaaaaaattttttttgttaaaaattaaatttaaaaaatttaaaatt  
taatttttaaaaaattttttataataattttttaattttatgtatt  
attttgattttaataaaaaaattttaaaaaaatgaataatgatttttttttttaaaatttaaaaaaattgttatttgaataaatttaaaatttttta  
taataaaaaaaatgaaatgattatatttaattatgttttgatgttttttttttaaaattaataatttttttatataaataattttttgatttgaatt  
aattaaatatattttttgaaaaattatgaaataaattaaatttttaaaaaaatatttttaattttttgttatatttttttaaaaaaaataaataa  
aaaaatgtgtatttaattaaattttaaaaaatttttaatttatataaatatgttttttaaaatttatataaatttttatatttatataattataaaat  
gtaattaaaaaaaattttttgaaattgtatttaatatataaataaaaaattttgatttttttaatttttatatttttttttttttttttttttttttt  
aaaaaattaaaaaaaatttttttataataattttttttaatatatttagggagttgtttgggatta

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**